



REÇU 08 OCT. 2004  
OMPI PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

07 JUIL. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

#### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

Post Available Copy

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
**page 1/2**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 eff/ 210502

REMISE DES PECHEMENS DATE : <b>2 JUIL 2003</b> LIEU : <b>75 INPI PARIS</b>  N° D'ENREGISTREMENT : <b>0308032</b>  NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI  DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI : <b>- 2 JUIL 2003</b>		<b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE <b>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  <b>CABINET ORES</b>  36 rue de St Pétersbourg 75008 PARIS
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b> BLOcp263/96FR		
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		
<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>		
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date _____ N° _____ Date _____
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  PETITS ARN INTERFERENTS SPECIFIQUES DES SOUS-UNITES ALPHA, ALPHA PRIME ET BETA DE LA PROTEINE KINASE CK2 ET LEURS APPLICATIONS.		
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		
Pays ou organisation Date _____ N° Pays ou organisation Date _____ N° Pays ou organisation Date _____ N° <input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b>		
<b>5 DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)		
<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>  <b>COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE</b>		
Nom ou dénomination sociale  Prénoms  Forme juridique  N° SIREN  Code APE-NAF		
Etablissement public  _____		
Domicile ou siège	Rue  Code postal et ville	31-33 rue de la Fédération  75011 PARIS
	Pays	FRANCE
	 Nationalité	 Française
N° de téléphone (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<input type="checkbox"/> <b>S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b>		

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2**

**BR2**

REMPIS DES PIÈCES  
2 JUIL 2005

Réserve à l'INPI

DATE  
75 INPI PARIS  
LIEU

0308032

N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom		ORES
Prénom		Béatrice
Cabinet ou Société		CABINET ORES
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36 rue de St Pétersbourg
	Code postal et ville	[7 5 10 0 18] PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00.
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88.
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt
		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/>
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>
Le Mandataire,  Béatrice ORES (n° 92-4046)		M. ROCHE



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04. Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

• ४० उपर्युक्त

# **BREVET D'INVENTION**

# **CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**cerfa**  
N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

**BR/SUITE**

REMISE DES PIÈCES		Réservé à l'INPI	
DATE	2308032		
LIEU	INPI PARIS		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		- 2 JUIL. 2003	
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire			
DB 829 © W / 01070			
Vos références pour ce dossier (facultatif) BLOC 2003/06FR			
<b>4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>			
<input type="checkbox"/> <b>Personne morale</b>		<input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	101 rue de Tolbiac	
	Code postal et ville	1715161514 PARIS Cedex 13	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>5. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>			
<input type="checkbox"/> <b>Personne morale</b>		<input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville		
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>6. SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>			
Le Mandataire, Béatrice ORES (n° 92-4046)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> M. ROCHE	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

L'invention concerne des petits ARN interférents (*small interfering RNA ou silencing inducing RNA*), dénommés ci-après siRNA, spécifiques des sous-unités  $\alpha$ ,  $\alpha'$  et  $\beta$  de la protéine kinase CK2 (ou caséine kinase 2) et leurs applications, notamment pour le traitement des cancers.

5 La protéine CK2 (ou caséine kinase 2) est une sérine/thréonine kinase pléiotrope et ubiquitaire, très conservée chez les eucaryotes ; cette holoenzyme est composée de deux sous-unités catalytiques  $\alpha$  et  $\alpha'$  et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  identiques associées en hétérotétramères  $\alpha\alpha'\beta_2$ ,  $\alpha'\beta_2\beta_2$  ou  $\alpha_2\beta_2$ .

10 Cette protéine joue un rôle essentiel dans le contrôle de nombreux processus physiopathologiques ; elle est indispensable au développement embryonnaire et à la différenciation terminale, ainsi qu'au contrôle de la progression du cycle cellulaire et de la survie cellulaire et son expression est dérégulée dans de nombreux cancers incluant des tumeurs d'origine virale où elle participe au blocage de l'apoptose (Buchou et al., Mol. Cell. Biol., 2003, 23, 908-915 ; Ahmed et al., Trends in Cell Biology, 2002, 12, 226-230).

15 Du fait de son rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques et de l'importance des pathologies associées à son dysfonctionnement, la protéine CK2 représente une nouvelle cible pharmacologique pour le développement de médicaments, notamment des anti-cancéreux et des anti-viraux.

20 Toutefois, étant donné que l'invalidation des gènes des sous-unités de la CK2 est létale chez les souris transgéniques « knock-out » et non compatible avec la viabilité cellulaire (Buchou et al., précité), le développement de telles molécules est resté très limité en l'absence de modèle *in vivo* ou *in vitro* permettant l'analyse fonctionnelle du rôle des sous-unités de la CK2.

25 En effet, les quelques molécules capables d'inhiber la CK2 qui ont été décrites présentent l'inconvénient d'être, soit peu spécifiques, soit peu actives, à savoir :

30 - des petites molécules analogues de l'ATP capables d'inhiber spécifiquement les sous-unités catalytiques  $\alpha$  et  $\alpha'$  ; on peut citer comme analogue de l'ATP, le TBB (Sarno et al., FEBS lett., 2001, 496, 44-48), qui est un dérivé de DRB pour augmenter sa spécificité pour la sous-unité alpha de la CK2. Toutefois, ces analogues de substrats de kinases (ATP) peuvent inhiber l'activité d'autres protéines

connues ou inconnues, mettant en œuvre l'ATP cellulaire. La spécificité de tels produits et notamment du TBB étant incertaine, leur utilisation est exclue *in vivo*,

- des oligonucléotides anti-sens dirigés contre les sous-unités de la CK2 (Ulloa et al., EMBO, 1993, 12, 1633-1640 ; Faust et al., Head & Neck, 2000, 22, 5 341-346) ; l'inhibition de l'activité CK2, démontrée uniquement *in vitro*, est partielle, transitoire et nécessite des doses très élevées d'oligonucléotides anti-sens (plusieurs dizaines à plusieurs centaines de µg/ml en fonction de la sensibilité des cellules).

Il ressort de ce qui précède qu'il n'existe pas de molécules capables d'inhiber spécifiquement la protéine kinase CK2 de façon efficace. En outre, il 10 n'existe pas de modèle *in vitro* ou *in vivo* permettant une analyse fonctionnelle de chacune des sous-unités CK2, utile pour le criblage de molécules capables de moduler l'activité de la protéine kinase CK2.

Il a été montré que des fragments d'ARN double-brin complémentaires d'un ARNm sont capables, lorsqu'ils sont introduits dans des cellules eucaryotes, d'inhiber fortement l'expression du gène correspondant en détruisant cet ARNm. Ce phénomène dénommé interférence ARN (pour une revue voir : Biofutur, 2002, volume 228, pages 52-61 ; Voorhoeve et al., TIBS, 2003, 21, 2-4) a été mis en évidence et particulièrement bien étudié chez les plantes et les invertébrés (*Caenorhabditis elegans*, drosophile) et l'on peut raisonnablement supposer 15 l'existence d'un mécanisme semblable chez les animaux supérieurs, puisque l'interférence ARN a également été observée dans des cellules humaines en culture. Toutefois, il a été montré que chez les invertébrés le phénomène était même capable 20 de se propager à l'ensemble de l'organisme et de persister après la division cellulaire, ce qui n'a pas été observé chez les animaux supérieurs.

25 Des petits fragments d'ARN double-brin, longs de 21 à 25 nucléotides, sont les véritables déclencheurs de l'inhibition. Ces siRNA peuvent pénétrer directement dans les cellules végétales et vraisemblablement aussi dans celles d'invertébrés. Chez la drosophile, il a été montré que les siRNA s'intègrent dans des complexes moléculaires appelés RISC (*RNA-induced silencing complex*). Avec 30 l'intervention d'une hélicase et d'ATP comme source d'énergie, ces complexes exposent les brins du siRNA. Si la séquence génétique du siRNA correspond à un fragment d'un gène qui s'exprime naturellement dans la cellule, l'ARN interférant exposé par le

complexe RISC va rencontrer un ARN messager porteur d'une séquence exactement complémentaire et les deux molécules vont s'associer. La présence du brin de siRNA provoque l'intervention d'enzymes qui vont sectionner l'ARN messager à l'endroit où il est lié au siRNA. Les deux parties de l'ARN messager sectionné, privées de l'une de leurs terminaisons habituelles, sont identifiées comme incomplètes et détruites par la cellule. L'ARN messager ciblé ne peut plus jouer son rôle et commander la synthèse d'une protéine. C'est ainsi que s'explique le caractère extrêmement spécifique de l'interférence ARN (R. Agami, Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6, 829-834 ; il n'y a réaction que si la séquence d'une vingtaine de nucléotides du siRNA a son homologue exact sur un ARN messager. La probabilité qu'un segment d'ADN, pris au hasard, corresponde à un siRNA donné est de l'ordre de 1/4 à la puissance 21 (21 nucléotides pouvant prendre chacun 4 «valeurs»), soit une chance sur plus de 4 milliards.

Ce phénomène d'inhibition spécifique de l'expression des gènes, ouvre des perspectives intéressantes dans le domaine de la génomique fonctionnelle et de la recherche pharmaceutique, respectivement pour identifier rapidement la fonction de nouveaux gènes, et pour sélectionner rapidement les gènes cibles et les médicaments candidats.

Ainsi, des siRNA spécifiques des ADNc codant pour des protéines virales ou cellulaires et capables d'inhiber la production des protéines correspondantes ont été décrits (p24 de HIV, gD de HSV, IL-12 ; Demande Internationale PCT WO 00/63364).

Toutefois, aucun siRNA capable d'inhiber spécifiquement l'expression des sous-unités de la protéine kinase CK2 n'a été décrit.

De manière surprenante, les Inventeurs ont isolé des siRNA spécifiques des transcrits des sous-unités  $\alpha$ ,  $\alpha'$  et  $\beta$  de la CK2 capables de bloquer sélectivement l'expression de la sous-unité  $\alpha$ , de la sous-unité  $\alpha'$  ou de la sous-unité  $\beta$  de la protéine kinase CK2 dans des cellules, et ce de façon efficace, spécifique et durable. De tels siRNA qui présentent un effet inhibiteur prolongé, de l'ordre de 72 heures, à des concentrations faibles (de l'ordre de 20 nM, *in vitro*), sont utiles comme médicament pour le traitement des cancers. En effet, une concentration de 20 nM de siRNA inhibe plus de 80% de l'expression des sous-unités de la protéine kinase CK2

(détectée par Western Blot) et des ARNm correspondants (quantification par RT-PCR au light-cycler) après 48 h dans des cellules humaines (MCF7, HeLa ou fibroblastes 3T3).

En outre, ces ARN qui inhibent spécifiquement l'expression de la 5 sous-unité  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  de la protéine kinase CK2 représentent également des outils pour l'analyse fonctionnelle du rôle respectif de chaque unité de la CK2 et le criblage de molécules capables de moduler (activer ou inhiber) l'activité d'une ou plusieurs de ces sous-unités de la CK2.

La présente invention a ainsi pour objet, un oligonucléotide correspondant 10 à un fragment d'un transcrit d'une sous-unité  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  d'une protéine kinase CK2, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

a1) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases correspondant à un fragment d'un transcrit d'une sous-unité  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  d'une protéine kinase CK2 de mammifère qui, en culture cellulaire et à une concentration comprise entre 1 et 200 15 nM et de préférence de moins de 20 nM d'oligonucléotide, inhibent plus de 80 % de l'expression de la sous-unité correspondante.

b1) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases correspondant respectivement à un fragment d'un transcrit de l'une des sous-unités suivantes d'une protéine kinase CK2 de mammifère :

20 - un fragment d'une sous-unité  $\alpha$  inclus entre les positions 18-74, 259-279, 565-585, 644-664, 720-750, 808-831 et 863-885, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité  $\alpha$  de la CK2 de souris n° NM\_007787 ou humaine n° NM\_001895, à partir du codon ATG : l'ATG est en position 1 de la séquence de souris n° NM\_007787 et en position 277 de la séquence humaine n° NM\_001895,

25 - un fragment d'une sous-unité  $\alpha'$  inclus entre les positions 49-69, 132-142, 306-326, 367-387, 427-447, 451-471, 595-615, 735-755, 827-847, 868-888, 949-969 et 988-1008, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité  $\alpha'$  de la CK2 de souris NM\_009974 ou humaine n° NM\_001896, à partir du codon ATG : l'ATG est en position 99 de la séquence de souris n° NM\_009974 et en position 164 30 de la séquence humaine n° NM\_001896, et

- un fragment d'une sous-unité  $\beta$  inclus entre les positions 80-100, 116-127, 164-208, 369-389, 400-420, 527-591 et 613-643, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité  $\beta$  de la CK2 humaine n° NM\_001320, ou de souris n° NP\_034105, à partir du codon ATG ; l'ATG est en position 1 de la séquence de souris n° NP\_034105 et en position 341 de la séquence humaine n° NM\_001320.

5 c1) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases présentant au moins 80 % d'identité avec les oligonucléotides définis en a1) ou en b1) et

d1) les oligonucléotides complémentaires des oligonucléotides simple-brin précédents, sens ou anti-sens.

10 Selon un mode de réalisation avantageux desdits oligonucléotides, ils sont, de préférence, sélectionnés dans le groupe constitué par :

15 a2) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases, sélectionnés dans le groupe constitué par les oligonucléotides correspondant respectivement à un fragment d'un transcript de l'une des sous-unités suivantes d'une protéine kinase CK2 de mammifère :

- un fragment d'une sous-unité  $\alpha$  présentant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à 13,  
- un fragment d'une sous-unité  $\alpha'$  présentant l'une des séquences SEQ ID NO:14 à 25,

20 - un fragment d'une sous-unité  $\beta$  présentant l'une des séquences SEQ ID NO:26 à 40.

b2) les oligonucléotides présentant au moins 80 % d'identité avec les séquences en a2), et  
c2) les oligonucléotides complémentaires des oligonucléotides simple-brin précédents, sens ou anti-sens.

25 Les Tableaux I, II et III suivants résument les propriétés des différents oligonucléotides de séquences SEQ ID NO:1 à 40.

TABLEAU I : oligonucléotides simple-brin et SiRNA  $\alpha$ 

Nom et n°	séquence sens de souris	SiRNA	Taille	Tm	%GC	Position/codon ATG NM_007787 souris et NM_001895 de la séquence humaine	Homologie Hu*/souris
CK2 $\alpha$ 1	cagaccccgagagactggga (SEQ ID NO:3)	gaccccgagaguacugggatt ttcuggggcucucaugaccu (SEQ ID NO:44)	21	61.5	57	54	2
CK2 $\alpha$ 2	aacacacacagaccccgagag (SEQ ID NO:2)	aauacacacagaccucgagtt ttuaugugugucuggagcuc (SEQ ID NO:43)	21	61.7	52.4	46	2
CK2 $\alpha$ 3	aagcagggccagagttacac (SEQ ID NO:1)	gcagggccagaguuuacactt ttcguccggucucaaugug (SEQ ID NO:41)	21	58.6	52.4	18	0
CK2 $\alpha$ 4	aacacacacagaccccgagag (SEQ ID NO:2)	cacacacagaccccgagagtt ttgugugugucuggggcucuc (SEQ ID NO:42)	21	59.3	52.4	46	2
CK2 $\alpha$ 5	aatttgagaggggggccaaac (SEQ ID NO:4)	uuugagaggugggggccaaactt ttaaacucuccaccggguug (SEQ ID NO:45)	21	59.8	52.4	259	2
CK2 $\alpha$ 6	aatgtccgagttgttcgaa (SEQ ID NO:5)	ugucccgaguuugcuiucucgatt ttacaggcuacaacgaagagcu (SEQ ID NO:46)	21	58.8	47.6	565	1
CK2 $\alpha$ 7	aacgataatcttgggcagacac (SEQ ID NO:10)	cgauaucuuugggcagacactt ttguauauagaacccgucugug (SEQ ID NO:51)	21	57.9	47.6	808	1
CK2 $\alpha$ 8	aaaaccagcatctgtcagcc (SEQ ID NO:12)	aaccagcaccuuugucagccctt ttuuggucguggaaacgaucgg (SEQ ID NO:53)	21	60.3	47.6	863	2
CK2 $\alpha$ 9	aaccagcatctgtcagccct (SEQ ID NO:13)	ccagcaccuuugucagccutt ttggucguggaaacagucggga (SEQ ID NO:54)	21	62.0	52.4	865	2
CK2 $\alpha$ 10	aggatagccaagggtctgg (SEQ ID NO:9)	aggauagccaaggguuuggtt ttuccuaucgguuccuugacc (SEQ ID NO:50)	21	58.9	47.6	730	0
CK2 $\alpha$ 11	tggtgaggatagccaagggtc (SEQ ID NO:8)	gugaggauagccaaggguuctt ttcacuccuaucgguuccaag (SEQ ID NO:49)	21	57.1	47.6	725	0
CK2 $\alpha$ 12	tcaagtggtgaggatagcca (SEQ ID NO:7)	caguuggugaggauagccatt ttguacaaccacuccuaucggu (SEQ ID NO:48)	21	58.8	47.6	720	0
CK2 $\alpha$ 13	gatatctgggcagacactcc (SEQ ID NO:11)	uaucuugggcagacacucctt ttauagaacccgucugugagg (SEQ ID NO:52)	21	58.6	47.6	811	1
CK2 $\alpha$ 14	tgtggagctgggtgtatgc (SEQ ID NO:6)	uggagcuuggguuguaugctt ttaccucgaacccaacauacg (SEQ ID NO:47)	21	61.8	47.8	644	1

\* Hu = humain

NB : l'ATG est en position 1 de la séquence de souris n° NM\_007787 et en position  
5 277 de la séquence humaine n° NM\_001895.

TABLEAU II : oligonucléotides simple-brin et SiRNA  $\alpha'$ 

Nom	Séquence sens humaine	SiRNA	TAILLE	Tm	%GC	Position	Homologie Hu/souris
CK2 $\alpha$ '1	aacagtctgaggagccgcgag (SEQ ID NO:14)	cagccugaggagccgcgagtttgcggacuccucggcgcuc (SEQ ID NO:55)	21	66.5	66,7	49	1 mésappariement
CK2 $\alpha$ '2	aaaacttgtcggggcaagta (SEQ ID NO:15)	aacuuggucggggcaaguattttuugaaccagccccguuau (SEQ ID NO:56)	21	59.5	47,6	132	2 mésappariements
CK2 $\alpha$ '3	aaaggaccctgtcaaagac (SEQ ID NO:16)	aggaccugugucaaagacttttuccuggacacaguuucug (SEQ ID NO:57)	21	62.4	47,6	306	1
CK2 $\alpha$ '4	aagcaacttaccagatctg (SEQ ID NO:17)	gcaacucuaccagauccugttttcguugagauugguaggac (SEQ ID NO:58)	21	55.8	47,6	367	0
CK2 $\alpha$ '5	aaagctctggattactgccc (SEQ ID NO:18)	agcucuggauuacugccacttttucgagaccuaaugacggug (SEQ ID NO:59)	21	58.2	47,6	427	0
CK2 $\alpha$ '6	aaggaaatcatgcacaggat (SEQ ID NO:19)	gggaaucaugcacagggauattttccuuaguacuguguccua (SEQ ID NO:60)	21	62.8	47,6	451	0
CK2 $\alpha$ '7	aagggaccagagctcttgt (SEQ ID NO:20)	gggaccagagccuuugugttttccuggucucgaggacuc (SEQ ID NO:61)	21	65.2	57,1	595	1
CK2 $\alpha$ '8	aattgccaagggtctggggac (SEQ ID NO:21)	uugccaaggguucuggggacttttaacgguuccaagaccccug (SEQ ID NO:62)	21	61.5	52,4	735	2 mais aux extrémités
CK2 $\alpha$ '9	aacattcacggaagcgctggg (SEQ ID NO:22)	cauucacggaaaggcgcuuggttttguagugccuucgcgacc (SEQ ID NO:63)	21	66.4	57,1	827	1
CK2 $\alpha$ '10	aacaggcaccttgtcagcccg (SEQ ID NO:23)	caggcacccuugucagcccgttttguccuggaaacagucgggc (SEQ ID NO:64)	21	61.0	61,9	868	2 dont un le dernier nt
CK2 $\alpha$ '11	aaagaggccatggaggcacccaa (SEQ ID NO:24)	agaggccauuggaggcacccattttucucgguaccucgugggu (SEQ ID NO:65)	21	68.4	57,1	949	0
CK2 $\alpha$ '12	aaggagcagtcccagccctgt (SEQ ID NO:25)	ggagcagucccagccuuguttttccucugcaggugcggaaaca (SEQ ID NO:66)	21	64.6	57,1	988	0

NB : l'ATG est en position 99 de la séquence de souris n° NM\_009974 et en position 5 de la séquence humaine n° NM\_001896.

TABLEAU III : oligonucléotides simple-brin et SiRNA  $\beta$ 

Nom	Séquence sens humaine (N°)	SiRNA	Taille	Tm	%GC	Position	Homologie hu/souris
CK2 $\beta$ 1	aagacaaccccaaccagatg (SEQ ID NO:32)	aagacaaccccaaccagagug ccuucuguuggguuggucuc (SEQ ID NO:73)	21	61.2	52.4	188	0 mésappariement
CK2 $\beta$ 2	tcaatgaggcaggccctcact (SEQ ID NO:27)	aaugagcaggguccucacu aguuacucgucccaggagau (SEQ ID NO:68)	21	62	52.4	116	0
CK2 $\beta$ 3	acctggaggcctgatgaagaac (SEQ ID NO:29)	accuggaggccugaugaagaac ccuggaccucggacuacuucu (SEQ ID NO:70)	21	60.5	52.4	164	1
CK2 $\beta$ 4	tggaggcctgatgaagaactgg (SEQ ID NO:30)	uggagccugaugaagaacugg ggaccucggacuacuucuuga (SEQ ID NO:71)	21	62.5	52.3	167	1
CK2 $\beta$ 5	ggagccctgatgaagaactgga (SEQ ID NO:31)	ggagccugaugaagaacugga gaccucggacuacuucuugac (SEQ ID NO:72)	21	62.5	52.3	168	1
CK2 $\beta$ 6	caatgaggcaggccctcacta (SEQ ID NO:28)	caauggagcaggguccucacua gaguuacucguccaggagug (SEQ ID NO:69)	21	60.1	52.3	117*	0
CK2 $\beta$ 7	ccaagagaccgtccaaaccagt (SEQ ID NO:35)	ccaagagaccugccaaaccagu cggguucucugacggguuggu (SEQ ID NO:76)	21	62	47.6	527	1
CK2 $\beta$ 8	cctgtcgacatcccaggatg (SEQ ID NO:33)	ccugucggacaucccagguga ccggacacggacuagggucca (SEQ ID NO:74)	21	62.2	52.3	369	3
CK2 $\beta$ 9	agcaactcaagagccagtc (SEQ ID NO:38)	agcaacuucaagagccaguc ggucguugaauucucggguc (SEQ ID NO:79)	21	60.8	52.3	613	0
CK2 $\beta$ 10	ccaggctctacggttcaaga (SEQ ID NO:36)	ccaggctctacggttcaaga cgggucgcagaaugccaaaguu (SEQ ID NO:77)	21	60.5	52.3	554	1
CK2 $\beta$ 11	agagcccaagtcaagacgattc (SEQ ID NO:40)	agagcccaagtcaagacgattc gttctgggucaguucugcua (SEQ ID NO:81)	21	60.6	52.3	623	0
CK2 $\beta$ 12	aacttcaagagcccaagtcaag (SEQ ID NO:39)	aacttcaagagcccaagtcaag gcuugaaguucucgggucagu (SEQ ID NO:80)	21	60.8	52.3	616	0
CK2 $\beta$ 13	aagctctactgccccaaatgc (SEQ ID NO:34)	gcucuacugccccaaagugctt ttcggaaugacggguucacg (SEQ ID NO:75)	21	63	52.4	400	1
CK2 $\beta$ 14	aagatccatccgatggctac (SEQ ID NO:37)	gauccauccgauggccuactt ttcugauaggcuaccggau (SEQ ID NO:78)	21	62.3	42.9	571	2
CK2 $\beta$ 15	aagactacatccaggacaat (SEQ ID NO:26)	gacuacauccaggacaauat ttcugauaguagguccugua (SEQ ID NO:67)	21	52.1	38.1	80	0

5

NB : l'ATG est en position 341 de la séquence humaine n° NM\_001320.

Conformément à l'invention, l'identité d'une séquence oligonucléotidique par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de nucléotides qui sont identiques, lorsque les séquences sont alignées, de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles. Au sens de la présente invention,

le terme altération inclut les délétions, les substitutions ou les insertions consécutives ou dispersées de nucléotides dans la séquence de référence.

L'invention englobe les oligoribonucléotides, les ribonucléotides et les oligodésoxynucléotides simple-brin ou double-brin naturels ou synthétiques, semi-synthétiques ou recombinants de n'importe quel organisme procaryote ou eucaryote, 5 comprenant essentiellement ou consistant en une séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-dessus.

Habituellement, un ribonucléotide désigne préférentiellement un ARN, alors que le terme oligonucléotide désigne préférentiellement un ADN simple-brin. 10

Toutefois, dans la présente invention, le terme oligonucléotide est utilisé de manière générique aussi bien pour les ARN simple-brin que les ADN simple-brin.

Le terme ribonucléotide est plus spécifiquement utilisé pour caractériser les siRNA (ARN double-brin). 15

Compte tenu des informations données en référence aux séquences humaines et de souris, l'Homme du métier est en mesure de trouver les positions équivalentes dans les séquences d'autres organismes accessibles dans les bases de données de séquences.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit oligonucléotide, 20 il s'agit d'un ribonucléotide sous la forme d'un ARN double-brin ou duplex d'ARN formé de deux brins complémentaires tels que :

i) le brin sens ou brin positif correspond à l'une des séquences telle que définie en a1), b1), c1), a2) ou b2) ci-dessus, et

ii) chacun desdits brins d'ARN contient une fonction phosphate terminale en 5' et hydroxyle en 3', ainsi que deux nucléotides simple-brin à son extrémité 3' de préférence une paire tt ou une paire aa ; un tel duplex d'ARN représente un siRNA, c'est-à-dire la forme active des oligonucléotides (ribonucléotides) selon l'invention, capables d'inhiber spécifiquement l'expression de la protéine kinase

30 CK2.

Lesdits ribonucléotides sont avantageusement sélectionnés dans le groupe constitué par les siRNA de séquences SEQ ID NO:41 à 81, représentées aux

Tableaux I à III ainsi que dans la liste de séquences dans laquelle ces ribonucléotides sont représentés par un seul brin (en gras dans les Tableaux).

Par rapport aux séquences simple-brin définies ci-dessus, ledit brin sens peut être décalé de deux nucléotides dans le sens 5'→3'.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit oligonucléotide, il s'agit d'un « précurseur » d'un siRNA tel que définis ci-dessus, sélectionné dans le groupe constitué par :

10 - un ARN simple-brin présentant une séquence telle que définie en a1), b1), c1), a2) ou b2) ou sa séquence complémentaire telle que définie en d1) ou en c2), correspondant à l'un des brins d'un siRNA tel que défini ci-dessus ; chacun des brins du siRNA est synthétisé séparément selon les techniques classiques de synthèse oligonucléotidique, puis les brins d'ARN complémentaires sont hybridés de façon à former des duplexes d'ARN ; de tels ARN sont utiles pour la production des siRNA *in vitro*.

15 - un ADN double-brin codant chacun des brins du siRNA tel que défini ci-dessus, lequel ADN est formé d'un brin sens présentant la séquence telle que définie en a1), b1), c1), a2) ou b2 et d'un brin complémentaire présentant la séquence telle que définie en d1) ou c2) ; de tels ADN clonés dans des vecteurs d'expression appropriés, permettent la transcription simultanée des deux brins complémentaires 20 dudit siRNA, comme décrit dans le brevet européen EP 0618 966 au nom de CIS BIO INTERNATIONAL. Ces ADN sont utiles pour la production desdits siRNA *in vitro* ou *in vivo*.

25 L'invention a également pour objet une cassette d'expression, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide tel que défini ci-dessus sous le contrôle d'éléments régulateurs appropriés de la transcription, notamment un promoteur, inductible ou non.

30 L'invention a également pour objet un vecteur eucaryote ou prokaryote comprenant un insert constitué par un oligonucléotide tel que défini ci-dessus ; de préférence ledit vecteur est un vecteur d'expression dans lequel est inséré une cassette d'expression telle que définie ci-dessus ; de manière préférée, ledit vecteur est un vecteur à ADN (plasmide ou virus recombinant) comprenant un oligodésoxy-

nucléotide double-brin tel que défini ci-dessus ; un tel vecteur codant un siRNA tel que défini ci-dessus est utile pour la production *in vitro* ou *in vivo* desdits siRNA.

Ces vecteurs sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues en elles-mêmes. De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple réplication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte. On peut utiliser entre autres des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus et les AAV dans lesquels a été insérée préalablement la séquence d'intérêt ou bien des vecteurs non-viraux tels que des plasmides.

Des vecteurs particulièrement bien adaptés à l'expression stable des siRNA, sont notamment ceux décrits dans T.R. Brummelkamp et al., *Science*, 2002, **296**, 550-553.

La présente invention a également pour objet des cellules eucaryotes ou procaryotes modifiées par un oligonucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un animal non-humain transgénique, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules modifiées par un oligonucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un siRNA ou un vecteur codant ledit siRNA tels que définis ci-dessus et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Lesdits oligonucléotides (isolés ou insérés dans un vecteur tel que défini ci-dessus) sont introduits dans des cellules-cibles soit par diffusion passive, soit en utilisant des méthodes physiques telles que l'électroporation ou la microinjection, soit en les associant à toute(s) substance(s) permettant le passage de la membrane plasmique, tels que des transporteurs comme les nanotransporteurs, des liposomes, des

lipides ou des polymères cationiques, tel que le phosphate de calcium (kit Sigma ref. CA-PHOS), l'amine (kit Ambion réf. 4502), la lipofectamine (kit Polyplus-transfection, réf. 101-05) ou le fugène-6 (Roche, réf 1815-091). En outre, on peut avantageusement combiner ces méthodes, par exemple en utilisant l'électroporation 5 associée à des liposomes.

Dans certains cas, il n'est pas nécessaire d'associer les siRNA selon l'invention avec une substance permettant leur passage à travers la membrane plasmique, dans la mesure où les siRNA sont assez petits pour diffuser librement dans les différents compartiments cellulaires. Ils peuvent agir au niveau du cytoplasme mais 10 aussi à la membrane nucléaire voire dans le noyau.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition, ledit siRNA est associé à toute(s) substance(s) permettant le passage de la membrane plasmique tels que des transporteurs comme les nanotransporteurs, des liposomes, des lipides ou des polymères cationiques.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, ledit siRNA est associé à toute substance permettant le ciblage dans des cellules, des tissus ou des organes spécifiques tels que des anticorps et des peptides, notamment des peptides aptes à passer la barrière hématoencéphalique comme les peptides Pep:Trans<sup>TM</sup> (<http://www.syntem.com/english/techpeptrans.html>). D'autres peptides 20 peuvent avantageusement être utilisés pour faciliter la transfection de siRNA au travers de la membrane plasmique des cellules ; les anticorps décrits dans Lu Z.R. et al. (Nature Biotechnol., 1999, 17, 1101-1104) peuvent notamment être utilisés pour cibler des cellules cancéreuses.

25 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, ledit siRNA est associé à au moins un agent anti-viral ou anti-cancéreux.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, elle comprend un mélange de plusieurs siRNA et notamment un mélange comprenant au moins un siRNA spécifique de la sous-unité  $\alpha$ , au moins un siRNA spécifique de la sous-unité  $\alpha'$  et au moins un siRNA spécifique de la sous-unité  $\beta$ .

30 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un siRNA ou d'un vecteur tel que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du cancer.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un siRNA ou d'un vecteur tel que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies virales.

5 La présente invention a également pour objet un produit contenant au moins un siRNA ou un vecteur tel que définis ci-dessus et un principe actif anticancéreux, en tant que préparation combinée pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement du cancer.

10 La présente invention a également pour objet un produit contenant au moins un siRNA ou un vecteur tel que définis ci-dessus et un principe actif antiviral, en tant que préparation combinée pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement des maladies virales.

15 La posologie utile varie en fonction de l'affection à traiter, de la voie et du rythme d'administration, ainsi que de la nature et du poids de l'espèce à traiter (humaine ou animale). Les oligonucléotides sont utilisés par voie digestive (orale, sublinguale), parentérale ou locale. Ils peuvent se présenter sous la forme de comprimés, simples ou dragéifiés, de gélules, de granules, de sirop, de suppositoires, de préparations injectables, de pommades, de crèmes, de gels, d'aérosol, lesquels sont préparés selon les méthodes usuelles. Dans ces formes galéniques, les oligonucléotides sont incorporés à des excipients habituellement employés dans des compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

20 *In vitro*, les concentrations qui peuvent être utilisées chez le rat sont comprises entre 10 nM et 200  $\mu$ M ; les doses *in vivo* peuvent donc être comprises entre 1  $\mu$ g et 20 mg/kg. Les doses correspondantes chez l'homme peuvent être déduites de ces informations.

25 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un oligonucléotide, d'un vecteur, des cellules eucaryotes ou procaryotes modifiées ou d'un animal transgénique, tels que définis ci-dessus pour le criblage de molécules capables de moduler sélectivement l'activité des sous-unités  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  de la protéine CK2 ; par exemple, il est possible d'inhiber spécifiquement l'expression d'une des sous-unités *in*

*vivo* ou *in vitro* et ainsi de cibler des molécules actives sur l'autre sous-unité ; de telles molécules représentent des médicaments potentiels, utiles pour la prévention et le traitement des pathologies liées à une dérégulation (augmentation ou diminution) de l'activité de la protéine kinase CK2 dans les cellules.

5                   On peut citer, à titre d'exemple de pathologie liée à une dérégulation de l'activité de la CK2, l'infertilité masculine en l'absence de CK2  $\alpha'$  non compensée par  $\alpha$  qui est absente dans les cellules germinales au dernier stade de différenciation des spermatogonies (Xu et al., Nature Gen., 1999, 23, 118-121).

10                  Par rapport aux oligonucléotides anti-sens de l'art antérieur, les siRNA selon l'invention présentent les avantages suivants :

- ils sont stables *in vitro* et *in vivo*,
- ils sont actifs à des concentrations faibles (de l'ordre de 20 nM *in vitro*) et inhibent de façon très efficace (> 80 % d'inhibition) l'expression et par conséquent l'activité de la protéine kinase CK2 dans les cellules,

15                  - ils présentent un effet prolongé, jusqu'à 6 jours.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du siRNA de séquence SEQ ID NO: 26 selon la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

20                  - la figure 1 illustre l'analyse par immunofluorescence de l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta$  de la protéine kinase CK2, par le siRNA correspondant à la séquence SEQ ID NO:26 ( $\beta$ si) ; les valeurs représentent les moyennes de deux mesures indépendantes  $\pm$  SEM. Une concentration finale de 100 nM de siRNA inhibe 90 % de l'expression de la sous-unité  $\beta$  de la protéine kinase CK2 ; il s'agit d'un rapport d'intensité de fluorescence, toutes les cellules étant marquées par de l'iodure de propidium et la CK2 $\beta$  étant détectée à l'aide d'un anticorps ( $\beta$ C) lui-même révélé par un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine.

25                  - la figure 2 illustre la cinétique d'inhibition de la CK2 en présence du siRNA de SEQ ID NO:26.

**EXEMPLE 1 : Expression d'un oligonucléotide selon l'invention en tant que désoxyribonucléotide dans des cellules 3T3 (fibroblastes).**

5 a) Une séquence d'ADN (gatccctgaagactacatccaggacttcaagagagtcc  
ggatgttagtcattttggaaa, SEQ ID NO:82), permettant l'expression du siRNA CK2 $\beta$ 15  
(SEQ ID NO:26), a été clonée dans le vecteur pSUPER selon les conditions décrites  
dans Brummelkamp TR et al. (Science, 2002, 296, 5567, 550-3).

b) Des cellules NIH 3T3 sont transfectées avec les vecteurs obtenus  
en a) selon un protocole de transfection à l'aide de Fugène 6 (Roche).

**EXEMPLE 2 : Préparation de ribonucléotides semi-synthétiques stabilisés.**

10 a) Les deux brins d'ARN sont synthétisés selon des méthodes connues (méthode au phosphoramidine ARN, voir notamment Elbashir S.M. et al., Nature, 2001, 411, 494-498).

b) Pour les stabiliser, il est avantageux de les modifier en insérant des nucléotides modifiés dans les deux brins d'ARN, au cours de la synthèse *in vitro*.

15 Le Tableau V ci-après illustre des exemples de nucléotides modifiés.

Nucléotide modifié	Première Application	Seconde Application
2' F-CTP	Résistance à la nucléase	
2' F-UTP	Résistance à la nucléase	
2' NH <sub>2</sub> -CTP	Résistance à la nucléase	
2' NH <sub>2</sub> -UTP	Résistance à la nucléase	
2' N <sub>3</sub> -CTP	Résistance à la nucléase	Modification post-synthèse
2' N <sub>3</sub> -UTP	Résistance à la nucléase	Modification post-synthèse
2-thio CTP	Réticulation UV	
2-thio UTP	Hybridation modifiée	Réticulation UV
4-thio UTP	Hybridation modifiée	Réticulation UV
5-iodo CTP	Réticulation UV	
5-iodo UTP	Réticulation UV	
5-bromo UTP	Réticulation UV	
2-chloro ATP	Réticulation UV	
Adenosine 5'-(1-thiotriphosphate)	Instable chimiquement	résistance à la nucléase
Cytidine 5'-(1-thiotriphosphate)	Instable chimiquement	résistance à la nucléase
Guanosine 5'-(1-thiotriphosphate)	Instable chimiquement	résistance à la nucléase
Uridine 5'-(1-thiotriphosphate)	Instable chimiquement	résistance à la nucléase
Pseudo-UTP		
5-(3-aminoallyl)-UTP	Modification post-synthèse	
5-(3-aminoallyl)-dUTP	Modification post-synthèse	

De tels nucléotides sont notamment disponibles chez Ambion (<http://www.ambion.com>).

5 **EXEMPLE 3 : Inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta$  de la protéine kinase CK2 par un siRNA (SEQ ID NO : 26)**

Des fibroblastes 3T3 ont été cultivés en goutte de 5  $\mu$ l (2000 cellules) dans du milieu de culture complet, dans les puits d'une lame pour immuno-fluorescence (40 puits d'un diamètre de 2 mm ; lame en super téflon, référence 74890.01 (PROLABO)). Les cellules 3T3 ont été transfectées à l'aide du kit de transfection siPort® (AMBION), avec une concentration finale de 5, 20, 50 ou 100 nM de siRNA dans les conditions exposées à l'exemple 1, dans un volume de 5  $\mu$ l, ou non-transfectées, puis les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37 °C. Les cellules ont ensuite été lavées et fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (4 % dans PBS). Les cellules sont ensuite colorées à l'iodure de propidium et marquées à l'aide 10 d'un anticorps primaire anti-sous-unité  $\beta$  de la protéine CK2 (anticorps  $\beta$ c ; Filhol et al 1994 Biochem Biophys Res Commun. 198 660-5) et d'un anticorps secondaire couplé à un fluorophore, tel que le cyanamide 3. La fluorescence est analysée à l'aide 15 d'un scanner (Genomic Solution) et l'inhibition de l'expression de la protéine kinase CK2 est exprimée par le rapport du nombre de cellules exprimant la protéine kinase CK2 (cellules rouges marquées par l'anticorps  $\beta$ c) sur le nombre total de cellules 20 (cellules bleues marquées à l'iodure de propidium).

Les résultats sont illustrés à la figure 1 et montrent qu'une concentration de 20 nM de siRNA inhibe 90 % de l'expression de la sous-unité  $\beta$  de la protéine kinase CK2.

25 **EXEMPLE 4 : Etude de la cinétique de l'inhibition de l'expression de la  $\beta$  CK2.**

Les cellules NIH 3T3 transfectées par siRNA $\beta$  (SEQ ID NO:26) (20 nM) sont cultivées pendant les temps indiqués à la figure 2. Après lavage dans PBS, elles sont lysées dans du tampon TDG (Tris, HCl pH 7,4 10 mM, Glycérol 0,1 %, DTT 1 mM, NaCl 500 mM Triton X-100 0,1 %) et centrifugées 15 min à 15000g à 30 4°C. Le surnageant est dosé pour son contenu en protéines et 40  $\mu$ g sont analysés par SDS-PAGE. Les protéines sont alors transférées sur membrane PVDF. Après satura-

tion de la membrane dans du PBS contenant 0,05% Tween 20 et 3% de BSA pendant 1 heure, la sous-unité CK2 $\beta$  est révélée à l'aide de l'anticorps  $\beta$ C.

On observe un blocage de l'expression de CK2 dès 24h.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite 5 nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

## REVENDICATIONS

1°) Oligonucléotide correspondant à un fragment d'un transcrit d'une sous-unité  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  d'une protéine kinase CK2, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

5 a) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases correspondant à un fragment d'un transcript d'une sous-unité  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  d'une protéine kinase CK2 de mammifère qui, en culture cellulaire et à une concentration comprise entre 1 et 200 nM, de préférence de moins de 20 nM d'oligonucléotide, inhibent plus de 80 % de l'expression de la sous-unité correspondante.

10 b1) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases correspondant respectivement à un fragment d'un transcrit de l'une des sous-unités suivantes d'une protéine kinase CK2 de mammifère :

- un fragment d'une sous-unité  $\alpha$  inclus entre les positions 18-74, 259-279, 565-585, 644-664, 720-750, 808-831 et 863-885, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité  $\alpha$  de la CK2 de souris n° NM\_007787 ou humaine n° NM\_001895, à partir du codon ATG

- un fragment d'une sous-unité  $\alpha'$  inclus entre les positions 49-69, 132-142, 306-326, 367-387, 427-447, 451-471, 595-615, 735-755, 827-847, 868-888, 949-969 et 988-1008, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité  $\alpha'$  de la CK2 de souris NM\_009974 ou humaine n° NM\_001896, à partir du codon ATG, et

- un fragment d'une sous-unité  $\beta$  inclus entre les positions 80-100, 116-127, 164-208, 369-389, 400-420, 527-591 et 613-643, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité  $\beta$  de la CK2 humaine n° NM\_001320 ou de souris n° NP\_034105, à partir du codon ATG.

25 c1) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases présentant au moins 80 % d'identité avec les oligonucléotides définis en a1) ou en b1) et

d1) les oligonucléotides complémentaires des oligonucléotides simple-brin précédents, sens ou anti-sens.

30 2°) Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est de préférence sélectionné dans le groupe constitué par :

a2) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases sélectionnés

### REVENDICATIONS

1°) Oligonucléotide correspondant à un fragment d'un transcript d'une sous-unité  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  d'une protéine kinase CK2, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

5                   a1) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases correspondant à un fragment d'un transcript d'une sous-unité  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  d'une protéine kinase CK2 de mammifère qui, en culture cellulaire et à une concentration comprise entre 1 et 200 nM, de préférence de moins de 20 nM d'oligonucléotide, inhibent plus de 80 % de l'expression de la sous-unité correspondante.

10                  b1) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases correspondant respectivement à un fragment d'un transcript de l'une des sous-unités suivantes d'une protéine kinase CK2 de mammifère :

- un fragment d'une sous-unité  $\alpha$  inclus entre les positions 18-74, 259-279, 565-585, 644-664, 720-750, 808-831 et 863-885, en référence à la séquence

15                  d'ADNc de la sous-unité  $\alpha$  de la CK2 de souris n° NM\_007787 ou humaine n° NM\_001895, à partir du codon ATG,

- un fragment d'une sous-unité  $\alpha'$  inclus entre les positions 49-69, 132-142, 306-326, 367-387, 427-447, 451-471, 595-615, 735-755, 827-847, 868-888, 949-969 et 988-1008, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité  $\alpha'$  de la CK2

20                  de souris NM\_009974 ou humaine n° NM\_001896, à partir du codon ATG, et

- un fragment d'une sous-unité  $\beta$  inclus entre les positions 80-100, 116-127, 164-208, 369-389, 400-420, 527-591 et 613-643, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité  $\beta$  de la CK2 humaine n° NM\_001320 ou de souris n° NP\_034105, à partir du codon ATG.

25                  c1) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases présentant au moins 80 % d'identité avec les oligonucléotides définis en a1) ou en b1) et

                        d1) les oligonucléotides complémentaires des oligonucléotides simple-brin précédents, sens ou anti-sens.

                        2°) Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il

30                  est de préférence sélectionné dans le groupe constitué par :

dans le groupe constitué par les oligonucléotides correspondant respectivement à un fragment d'un transcript de l'une des sous-unités suivantes d'une protéine kinase CK2 de mammifère :

- un fragment d'une sous-unité  $\alpha$  présentant l'une des séquences  
5 SEQ ID NO:1 à 13,
- un fragment d'une sous-unité  $\alpha'$  présentant l'une des séquences  
SEQ ID NO:14 à 25,
- un fragment d'une sous-unité  $\beta$  présentant l'une des séquences  
SEQ ID NO:26 à 40.

10 b2) les oligonucléotides présentant au moins 80 % d'identité avec les séquences en a2), et

c2) les oligonucléotides complémentaires des oligonucléotides simple-brin précédents, sens ou anti-sens.

3°) Ribonucléotide, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un ARN double-brin formé de deux brins complémentaires tels que :

- i) le brin sens ou brin positif correspond à l'une des séquences telle que définie aux revendications 1 ou 2, en a1), b1), c1), a2) ou b2), et
- ii) chacun desdits brins d'ARN contient une fonction phosphate terminale en 5' et hydroxyle en 3', ainsi que deux nucléotides simple-brin à son extrémité 3'.

4°) Ribonucléotide selon la revendication 3, caractérisé en ce que lesdits nucléotides simple-brin des extrémités 3' sont sélectionnés dans le groupe constitué par les paires tt et aa.

5°) Ribonucléotide selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les siRNA de séquences SEQ ID NO:41 à 81.

6°) Oligonucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

- un ARN simple-brin présentant une séquence telle que définie en a1), b1), c1), a2) ou b2) ou sa séquence complémentaire telle que définie en d1) ou en c2), et
- un ADN double-brin formé d'un brin sens présentant la séquence

a2) les oligonucléotides simple-brin de 21 à 23 bases, sélectionnés dans le groupe constitué par les oligonucléotides correspondant respectivement à un fragment d'un transcrit de l'une des sous-unités suivantes d'une protéine kinase CK2 de mammifère :

5 - un fragment d'une sous-unité  $\alpha$  présentant l'une des séquences SEQ ID NO:1 à 13,

- un fragment d'une sous-unité  $\alpha'$  présentant l'une des séquences SEQ ID NO:14 à 25,

- un fragment d'une sous-unité  $\beta$  présentant l'une des séquences SEQ

10 ID NO:26 à 40.

b2) les oligonucléotides présentant au moins 80 % d'identité avec les séquences en a2), et

c2) les oligonucléotides complémentaires des oligonucléotides simple-brin précédents, sens ou anti-sens.

15 3°) Ribonucléotide, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un ARN double-brin formé de deux brins complémentaires tels que :

i) le brin sens ou brin positif correspond à l'une des séquences telle que définie aux revendications 1 ou 2, en a1), b1), c1), a2) ou b2), et

ii) chacun desdits brins d'ARN contient une fonction phosphate

20 terminale en 5' et hydroxyle en 3', ainsi que deux nucléotides simple-brin à son extrémité 3'.

4°) Ribonucléotide selon la revendication 3, caractérisé en ce que lesdits nucléotides simple-brin des extrémités 3' sont sélectionnés dans le groupe constitué par les paires tt et aa.

25 5°) Ribonucléotide selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les siRNA de séquences SEQ ID NO:41 à 81.

6°) Oligonucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

30 - un ARN simple-brin présentant une séquence telle que définie en a1), b1), c1), a2) ou b2) ou sa séquence complémentaire telle que définie en d1) ou en c2), et

telle que définie en a1), b1), c1), a2) ou b2 et d'un brin complémentaire présentant la séquence telle que définie en d1) ou c2).

7°) Cassette d'expression, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide selon les revendications 1 à 6, sous le contrôle d'éléments régulateurs appropriés de la transcription.

8°) Vecteur eucaryote ou procaryote, caractérisé en ce qu'il comprend un insert constitué par un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

9°) Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur à ADN comprenant un insert constitué par un ADN tel que défini à la revendication 6.

10°) Cellule eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, une cassette d'expression selon la revendication 7 ou un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9.

11°) Animal non-humain transgénique, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules modifiées par un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, une cassette d'expression selon la revendication 7 ou un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9.

12°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide selon la revendication 3 ou un vecteur codant ledit oligonucléotide selon la revendication 8 ou la revendication 9 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

13°) Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce que le dit oligonucléotide est associé à toute(s) substance(s) permettant le passage de la membrane plasmique.

14°) Composition pharmaceutique selon la revendication 12 ou la revendication 13, caractérisée en ce que le dit oligonucléotide est associé à toute(s) substance(s) permettant le ciblage dans des cellules, des tissus ou des organes.

15°) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que le dit oligonucléotide est associé à au moins un agent anti-viral ou anti-cancéreux.

- un ADN double-brin formé d'un brin sens présentant la séquence telle que définie en a1), b1), c1), a2) ou b2 et d'un brin complémentaire présentant la séquence telle que définie en d1) ou c2).

5 7°) Cassette d'expression, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide selon les revendications 1 à 6, sous le contrôle d'éléments régulateurs appropriés de la transcription.

8°) Vecteur eucaryote ou procaryote, caractérisé en ce qu'il comprend un insert constitué par un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

10 9°) Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur à ADN comprenant un insert constitué par un ADN tel que défini à la revendication 6.

15 10°) Cellule eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, une cassette d'expression selon la revendication 7 ou un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9.

20 11°) Animal non-humain transgénique, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules modifiées par un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, une cassette d'expression selon la revendication 7 ou un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9.

12°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide selon la revendication 3 ou un vecteur codant ledit oligonucléotide selon la revendication 8 ou la revendication 9 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 13°) Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce que le dit oligonucléotide est associé à une substance permettant le passage de la membrane plasmique, sélectionnée dans le groupe constitué par : les nanotransporteurs, les liposomes, les lipides et les polymères cationiques et le phosphate de calcium.

30 14°) Composition pharmaceutique selon la revendication 12 ou la revendication 13, caractérisée en ce que le dit oligonucléotide est associé à une

16°) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange de plusieurs siRNA et notamment un mélange comprenant au moins un siRNA spécifique de la sous-unité  $\alpha$ , au moins un siRNA spécifique de la sous-unité  $\alpha'$  et au moins un siRNA spécifique de la sous-unité  $\beta$ .

17°) Utilisation d'un oligonucléotide selon la revendication 3 ou d'un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du cancer.

18°) Utilisation d'un oligonucléotide selon la revendication 3 ou 10 d'un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies virales.

19°) Produit contenant au moins un oligonucléotide selon la revendication 3 ou un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9 et un principe actif anti-cancéreux, en tant que préparation combinée pour une utilisation simultanée, 15 séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement du cancer.

20 20°) Produit contenant au moins un oligonucléotide selon la revendication 3 ou un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9 et un principe actif anti-viral, en tant que préparation combinée pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement des maladies virales.

21°) Utilisation d'un oligonucléotide selon la revendication 3, d'un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9, des cellules eucaryotes ou procaryotes selon la revendication 10 ou d'un animal transgénique selon la revendication 11, pour le criblage de molécules capables de moduler l'activité des sous-unités  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  de la protéine kinase CK2.

substance permettant le ciblage dans des cellules, des tissus ou des organes, sélectionnée dans le groupe constitué par : les peptides et les anticorps.

15°) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que le dit oligonucléotide est associé à au moins un agent anti-viral ou anti-cancéreux.

16°) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange de plusieurs siRNA et notamment un mélange comprenant au moins un siRNA spécifique de la sous-unité  $\alpha$ , au moins un siRNA spécifique de la sous-unité  $\alpha'$  et au moins un siRNA spécifique de la sous-unité  $\beta$ .

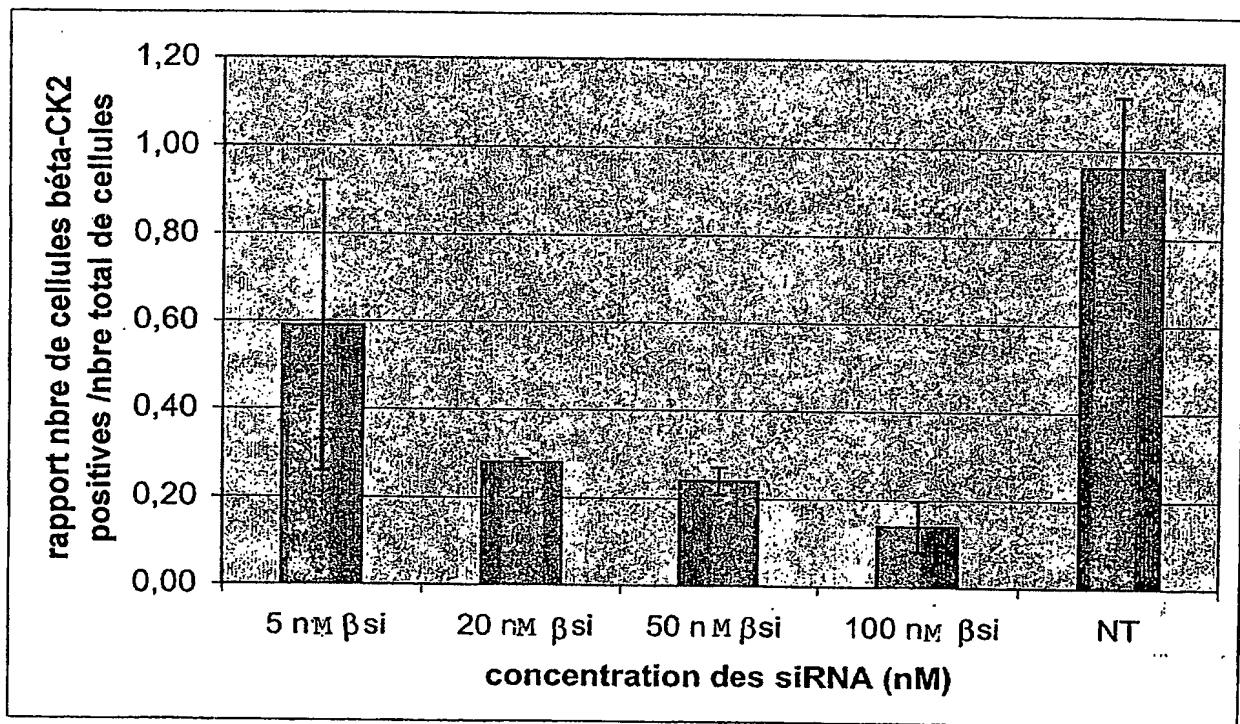
17°) Utilisation d'un oligonucléotide selon la revendication 3 ou d'un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du cancer.

18°) Utilisation d'un oligonucléotide selon la revendication 3 ou d'un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies virales.

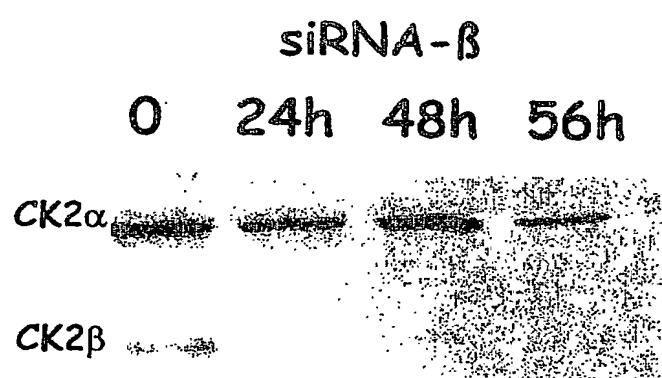
19°) Produit contenant au moins un oligonucléotide selon la revendication 3 ou un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9 et un principe actif anti-cancéreux, en tant que préparation combinée pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement du cancer.

20°) Produit contenant au moins un oligonucléotide selon la revendication 3 ou un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9 et un principe actif anti-viral, en tant que préparation combinée pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement des maladies virales.

21°) Utilisation d'un oligonucléotide selon la revendication 3, d'un vecteur selon la revendication 8 ou la revendication 9, des cellules eucaryotes ou prokaryotes selon la revendication 10 ou d'un animal transgénique selon la revendication 11, pour le criblage de molécules capables de moduler l'activité des sous-unités  $\alpha$ ,  $\alpha'$  ou  $\beta$  de la protéine kinase CK2.



**Figure 1**



> 90% inhibition

FIGURE 2

0263-096-FR-SEQ.ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA)  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE  
SCHAACK, Béatrice  
COCHET, Claude  
FILHOL-COCHET, Odile  
FOUQUE, Brigitte

<120> PETITS ARN INTERFERENTS SPECIFIQUES DES SOUS-UNITES ALPHA,  
ALPHA', ET BETA DE LA PROTEINE KINASE CK2 ET LEURS APPLICATIONS

<130> F263/96FR

<160> 82

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> *Mus musculus*

<400> 1  
aagcaggccc agagtttaca c

21

<210> 2  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> *Mus musculus*

<400> 2  
aacacacacaca gaccccgaga g

21

<210> 3  
<211> 21  
<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 3  
cagaccccgaa gagtactggg a

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 4  
aattttagagag gtggggcccaa c

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 5  
aatgtcccgag ttgcttctcg a

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 6  
tgtggagctt gggttgtatg c

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 7  
tcagttggtg aggatagccaa

20

<210> 8

<211> 21

0263-096-FR-SEQ.ST25

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 8

tggtgaggat agccaaaggtt c

21

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 9

aggatagcca aggttctgg

19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 10

aacgatatatct tgggcagaca c

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 11

gatatcttgg gcagacactc c

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 12

aaaaccagca tcttgcagc c

21

<210> 13

0263-096-FR-SEQ.ST25

<211> 21

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 13  
aaccagcatc ttgtcagccc t

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 14  
aacagtctga ggagccgcga g

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 15  
aaaacttggc cggggcaagt a

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 16  
aaaggaccct gtgtcaaaga c

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 17  
aagcaactct accagatcct g

21

0263-096-FR-SEQ. ST25

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

aaagctctgg attactgc当地 c

21

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

aaggaaatca tgcacaggga t

21

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 20

aagggaccag agctccttgt g

21

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 21

aattgccaag gttctgggga c

21

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 22

0263-096-FR-SEQ. ST25

21

aacattcacg gaagcgctgg g

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

aacaggcacc ttgtcagccc g

21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

aaagaggcca tggagcaccc a

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

aaggagcagt cccagccttg t

21

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

aagactacat ccaggacaat

20

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

0263-096-FR-SEQ.ST25

<400> 27  
tcaatgagca ggtccctcac t 21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28  
caatgagcag gtccctcact a 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29  
acctggagcc tcatgtaaagaa c 21

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30  
tggaggcctga tgaagaactg g 21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31  
ggaggcctgat gaagaactgg a 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32 aagacaaccc caaccagagt g 21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33 cctgtcggac atcccaggtg a 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34 aagctctact gccccaaagtg c 21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35 ccaagagacc tgccaaaccag t 21

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36 ccaggctcta cggtttcaag a 21

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

0263-096-FR-SEQ.ST25

<213> Homo sapiens

<400> 37  
aagatccatc cgatggccta c

21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38  
agcaacttca agagccagt c

21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39  
aacttcaaga gcccagtcaa g

21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40  
agagccagt caagacgatt c

21

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 41  
gcagggccag aguuuacact t

21

0263-096-FR-SEQ.ST25

<210> 42  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> brin sens siRNA

<400> 42  
cacacacaga ccccgagagt t 21

<210> 43  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> brin sens siRNA  
<400> 43 21  
aauacacacaca gaccucgagt t

<210> 44  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> brin sens siRNA  
<400> 44 21  
gaccggaga guacuggat t

<210> 45  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> brin sens siRNA

0263-096-FR-SEQ.ST25

<400> 45  
uuugagaggu gggcccaact t

21

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 46  
uguccgaguu gcuucucgat t

21

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 47  
uggagcuugg guuguaugct t

21

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 48  
caguugguga ggauagccat t

21

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

0263-096-FR-SEQ.ST25

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 49  
gugaggauag ccaagguuct t

21

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 50  
aggauagcc a agguucuggt t

21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 51  
cgauaucuug ggcagacact t

21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 52  
uaucuugggc agacacucct t

21

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 53  
aaccaggacc uugucagcct t

21

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 54  
ccagcaccuu gucagccut t

21

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 55  
cagccugagg agccgcgagt t

21

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 56  
aacuuggucg gggcaaguat t

21

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 57

aggaccucugu gucaaagact t

21

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 58

gcaacucuac cagaauccugt t

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 59

agcucuggau uacugccact t

21

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 60

0263-096-FR-SEQ.ST25

21

gggaaucaug cacagggaut t

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; brin sens siRNA

&lt;400&gt; 61

gggaccagag cuccuugugt t

21

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; brin sens siRNA

&lt;400&gt; 62

uugccaaggu ucuggggact t

21

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; brin sens siRNA

&lt;400&gt; 63

cauucacgga agcgcuggg t

21

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

<223> brin sens siRNA

<400> 64  
caggcacccuu gucagccccgt t

21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 65  
agaggccaug gaggcacccat t

21

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 66  
ggagcagucc cagccuugut t

21

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 67  
gacuacaucc aggacaaucc

20

<210> 68

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; brin sens siRNA

&lt;400&gt; 68

aaugagcagg uccucacu

19

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; brin sens siRNA

&lt;400&gt; 69

caaugagcag guccucacu a

21

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; brin sens siRNA

&lt;400&gt; 70

accuggagcc ugaugaagaa c

21

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; brin sens siRNA

&lt;400&gt; 71

uggagccuga ugaagaacug g

21

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 72 21  
ggagccugau gaagaacugg a

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 73 21  
aagacaaccc caaccagagu g

<210> 74

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 74 21  
ccugucggac aucccaggug a

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 75 21  
gcucuacugc cccaaugugct t

0263-096-FR-SEQ.ST25

<210> 76  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> brin sens siRNA

<400> 76  
ccaagagacc ugccaaccag u

21

<210> 77  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> brin sens siRNA  
<400> 77  
ccaggctcta cggtttcaag a

21

<210> 78  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> brin sens siRNA  
<400> 78  
gauccauccg auggccuact t

21

<210> 79  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> brin sens siRNA

<400> 79 agcaacuuca agagcccagu c 21

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 80 aacttcaaga gcccagtcaa g 21

<210> 81

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 81 agagcccagt caagacgatt c 21

<210> 82

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 82 gatcccctga agactacatc caggacttca agagagtccct ggatgttagtc ttcatttttg 60  
gaaa 64

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

### DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

### DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BL0cp263/96FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0308032
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)	
PETITS ARN INTERFERENTS SPECIFIQUES DES SOUS-UNITES ALPHA, ALPHA PRIME ET BETA DE LA PROTEINE KINASE CK2 ET LEURS APPLICATIONS.	

### LE(S) DEMANDEUR(S) :

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

### DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<b>1</b> Nom	SCHAACK	
Prénoms	Béatrice	
Adresse	Rue	17 rue Mozart
	Code postal et ville	38000 GRENOBLE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b> Nom	COCHET	
Prénoms	Claude	
Adresse	Rue	1 allée du Sorbier
	Code postal et ville	38640 CLAIX
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b> Nom	FILHOL-COCHET	
Prénoms	Odile	
Adresse	Rue	1 allée du Sorbier
	Code postal et ville	38640 CLAIX
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

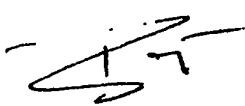
### DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

Le 2 Juillet 2003,



Beatrice ORES (n° 92-4046)

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**

**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

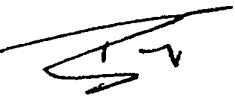
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.../2...**

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BLOcp263/96FR													
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0308032													
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)														
PETITS ARN INTERFERENTS SPECIFIQUES DES SOUS-UNITES ALPHA, ALPHA PRIME ET BETA DE LA PROTEINE KINASE CK2 ET LEURS APPLICATIONS.														
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>														
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE														
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>														
<table border="1"> <tr> <td><b>1</b> Nom</td> <td>FOUQUE</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Brigitte</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td>3 avenue Aristide Bergès</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Code postal et ville</td> </tr> <tr> <td colspan="2">[3 8 1 7 0] SEYSSINET PARISET</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>		<b>1</b> Nom	FOUQUE	Prénoms	Brigitte	Adresse	Rue	3 avenue Aristide Bergès	Code postal et ville		[3 8 1 7 0] SEYSSINET PARISET		Société d'appartenance (facultatif)	
<b>1</b> Nom	FOUQUE													
Prénoms	Brigitte													
Adresse	Rue													
	3 avenue Aristide Bergès													
Code postal et ville														
[3 8 1 7 0] SEYSSINET PARISET														
Société d'appartenance (facultatif)														
<table border="1"> <tr> <td><b>2</b> Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Code postal et ville</td> </tr> <tr> <td colspan="2">[ ]</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>		<b>2</b> Nom		Prénoms		Adresse	Rue		Code postal et ville		[ ]		Société d'appartenance (facultatif)	
<b>2</b> Nom														
Prénoms														
Adresse	Rue													
Code postal et ville														
[ ]														
Société d'appartenance (facultatif)														
<table border="1"> <tr> <td><b>3</b> Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Code postal et ville</td> </tr> <tr> <td colspan="2">[ ]</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>		<b>3</b> Nom		Prénoms		Adresse	Rue		Code postal et ville		[ ]		Société d'appartenance (facultatif)	
<b>3</b> Nom														
Prénoms														
Adresse	Rue													
Code postal et ville														
[ ]														
Société d'appartenance (facultatif)														
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.														
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> <b>(Nom et qualité du signataire)</b>														
 Le 2 Juillet 2003,														
Béatrice ORES (n° 92-4046)														

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**